

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年3月29日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/21214 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 48/00, 38/18, A61P 9/00, 9/10, 25/00, 25/28, 43/00 // A61K 35/76
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06347
- (22) 国際出願日: 2000年9月18日 (18.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平11/267024 1999年9月21日 (21.09.1999) JP  
特願2000/241205 2000年8月9日 (09.08.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): メドジーンバイオサイエンス株式会社 (MEDGENE BIOSCIENCE, INC.) [JP/JP]; 〒560-0085 大阪府豊中市上新田1丁目24番C-1101号 Osaka (JP).
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 森下竜一 (MORISHITA, Ryuichi) [JP/JP]; 〒532-0003 大阪府大阪市淀川区宮原2-11-22-502 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 荻原俊男 (OGIHARA, Toshio) [JP/JP]; 〒562-0046 大阪府箕面市桜ヶ丘2-7-29 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENE THERAPY FOR CEREBROVASCULAR DISORDERS

(54) 発明の名称: 脳血管障害のための遺伝子治療

(57) Abstract: Cerebrovascular disorders (cerebrovascular obstruction, cerebral infarction, cerebral thrombosis, cerebral embolism, cerebral attack, cerebral hemorrhage, Willis' circle occlusion, cerebrovascular dementia, Alzheimer's dementia, etc.) can be efficaciously treated or prevented by transferring an HGF (hepatocyte growth factor) gene and/or a VEGF (vascular endothelial growth factor) gene into the subarachnoidal space of humans.

(57) 要約:

HGF (肝実質細胞増殖因子) 遺伝子及び/又はVEGF (血管内皮増殖因子) 遺伝子をヒトのクモ膜下腔に導入することにより、脳血管閉塞、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、脳卒中、脳出血、もやもや病、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆等の脳血管障害を有効に治療又は予防することができる。

WO 01/21214 A1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 明 細 書

## 脳血管障害のための遺伝子治療

## 技術分野

- 5 本発明は、脳血管障害を治療又は予防するための新規な遺伝子治療剤、および当該遺伝子治療剤の新規な投与方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、HGF（肝実質細胞増殖因子）遺伝子及び／又はVEGF（血管内皮増殖因子）遺伝子を有効成分として含有する脳血管障害の治療又は予防剤、あるいは当該治療又は予防剤をクモ膜下腔に投与することを特徴とする新規な投与方法などに関する。

## 10 背景技術

- 脳動脈のアテローム性動脈硬化症によって引き起こされる脳閉塞性疾患、もやもや病等はしばしば脳の慢性的な血流量低下を引き起こす。この状態から、その後の脳虚血性事象だけでなく痴呆を含む神経病理学的変化に至ることがある（Stroke 25, 1022-1027、Stroke 29, 1058-1062(1998)、Stroke 24, 259-  
15 264(1993)、Ann. N. Y. Acad. Sci. 695, 190-193(1993)）。しかし、これらの脳血管性障害における血流量低下を改善する有効な治療法は未だ確立されていない。虚血性発作においては、特に虚血周辺部で活発な血管新生を生じさせることが知られており、そしてこれはヒトのより長期の生存に関与している（Stroke 25, 1794-1798(1994)）。それ故血管新生は、脳虚血症の回復や将来の発作予防に  
20 において重要な役割を果たすと考えられている。

新しい血管の発生や血管新生は親血管の内皮細胞の活性化と共に開始されるが、インビボでこの血管新生を刺激するだけでなく、インビトロで内皮細胞に対してマイトジェニックであることが示されている増殖因子を「血管新生増殖因子」と称している。

- 25 血管新生増殖因子の治療的な関与は、Folksmanらによって最初に文献発表された（N. Engl. J. Med. 285, 1182-1186(1971)）。またその後の研究によって、組換え血管新生因子、例えば繊維芽細胞増殖因子（FGF）ファミリー（Science 257, 1401-1403(1992)、Nature 362, 844-846(1993)）、内皮細胞増殖因子（J. Surg. Res. 54, 575-583(1993)）、及び血管内皮増殖因子（VEGF）などを使

用して心筋及び後肢虚血症の動物モデルにおける側副血行路の発達を促進及び／又は増進させ得ることが確認されている（Circulation 90, II-228-II-234(1994)）。さらに本発明者らは、HGFがVEGFと同様に内皮特異的増殖因子として作用することを見出している（J. Hypertens. 14, 1067-1072(1996)）。

- 5 血管障害を治療するために前記の如き血管新生増殖因子を用いる戦略は、「治療的血管新生」と称されている。より最近では、この戦略はヒトの虚血性疾患に適用されている。しかしながら、脳虚血症に対してもこの戦略が有効であるかどうかは、今日までのところ知られていない。

- 肝細胞増殖因子（HGF）は、多様な細胞に対して分裂誘発活性、運動性促進  
10 活性及び形態形成活性を示すプレイオトロフィックなサイトカインである（Nature 342, 440-443(1989)）。

- HGFの脳における作用については、以下のような報告がなされている。すなわち、HGFと膜貫通型チロシンキナーゼのc-Met/HGFレセプターは共に  
15 脳の種々の領域で発現しており、HGFとc-Met間の機能的な結合によって初代培養海馬のニューロンの生存が高められることや、インビトロでのニューロン  
発達において神経突起の伸長が誘導されることが知られている（J. Cell. Biol. 126, 485-494(1994)、特開平7-89869号公報）。最近、HGFが虚  
血中のニューロン内で誘導されることが報告されており（Brain Res. 799, 311-316(1998)）、また組換えHGFが海馬における虚血後の遅発性神経細胞死に対  
20 して神経保護効果を有していることや、組換えHGFを脳内に連続的に注入することにより梗塞の大きさの減少に有効であったことが報告されている（J. Cereb. Blood Flow Metab. 18, 345-348(1998)。これらの知見から、HGFは  
脳虚血中の重要な神経栄養因子として作用するものと考えられる。

- 他方、血管内皮増殖因子（VEGF）は、内皮細胞に対してマイトジェニック  
25 な二量体糖タンパク質であり、そして血管透過性を高める能力を有している。VEGFは内皮細胞に対して直接的且つ特異的なマイトジェニックな効果を有している（Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 851-858（1989））。チロシンキナーゼ  
レセプターFlt、Flk-1及びKDRを含むVEGFの結合部位は、他のタイプの細胞ではなく内皮細胞上に存在しているため、VEGFの効果は内皮細胞

に限定されている。

VEGFの脳における作用に関しては、中枢神経系においてVEGFは虚血性障害によって脳内に急速に誘導されることが報告されており (Mol. Cell. Biol., 16, 4604-4613(1996))、また組換えVEGFの脳表面への投与が、梗塞量の減少に有効であったことが報告されている (J. Cereb. Blood Flow Metab. 18, 887-895 (1998))。しかし詳しいことは分かっていない。

以上のようなHGFおよびVEGFの作用の他、別の観点からは、前述の如くこれらの因子は強力な血管新生増殖因子である (J. Cell. Biol. 119, 629-641(1992)、Biochem. Biophys. Res. Commun. 161, 851-858(1989))。虚血性発作は、特に虚血周辺部で活発な血管新生を生じさせることが知られており、そしてこれはヒトのより長期の生存と関係している (Stroke 25, 1794-1798(1994))。それ故、血管新生は脳虚血症の回復や将来の発作予防で重要な役割を果たすと考えられる。しかしながら、脳虚血症等に対して実際に組換えHGFやVEGFを用いた治療的血管新生が可能かどうかについては知られていない。さらに、組換え血管新生増殖因子は急速に消失するので脳内に連続的に注入しなければならず、そしてこの操作は臨床状況下ではかなり危険であり、非現実的である。それ故、遺伝子導入技術を用いて虚血性の脳内や周辺で血管新生増殖因子を持続して発現及び分泌できれば合理的であると考えられる。しかしながら、HGF遺伝子やVEGF遺伝子の脳虚血性障害への適用 (遺伝子治療) については全く例がなく、また脳という組織の特殊性を反映してか、現在までのところその適用性に関して

#### 発明の開示

本発明は、脳血管障害を治療又は予防するための新規な遺伝子治療剤、および当該遺伝子治療剤の新規な投与方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、HGF (肝実質細胞増殖因子) 遺伝子及び/又はVEGF (血管内皮増殖因子) 遺伝子を有効成分として含有する脳血管障害の治療又は予防剤、あるいは当該治療又は予防剤をクモ膜下腔に投与することを特徴とする新規な投与方法などに関する。

本発明者らは、HGF及びVEGFの遺伝子導入によって、虚血状態の脳表面に血管新生を誘導することができるかどうかを *in vivo* で検討した。その結果、

- (a) HGF遺伝子又はVEGF遺伝子トランスフェクション後、長期間にわたってこれらのタンパク質が脳内で検出されること、(b) HGF遺伝子又はVEGF遺伝子トランスフェクションによる治療法により虚血状態の脳表面に血管新生を誘導できること、(c) HGF遺伝子又はVEGF遺伝子のトランスフェクションが血管の閉塞によって引き起こされる脳の血流量低下を治療するのに有効であること、そして(d) この治療法は、閉塞前に実施したときも有効であることを明らかにした。更に、これらの遺伝子導入はクモ膜下腔への導入という新しい投与法により効率的に達成されることも明らかにした。

- 加えて本発明者らは、虚血による海馬CA-1領域の遅発性神経細胞死が、HGF遺伝子導入により抑制されることを見出した。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

すなわち本発明により、以下の(1)から(23)の発明が提供される。

- (1) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子を有効成分として含有する、脳血管障害の治療又は予防剤、
- 15 (2) 脳血管障害が、脳血管閉塞、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、脳卒中、脳出血、もやもや病、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆、脳出血後遺症又は脳梗塞後遺症である、上記(1)記載の治療又は予防剤、
- (3) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の血流量低下の治療又は予防剤、
- 20 (4) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の血管新生促進剤、
- (5) HGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の神経細胞死の抑制剤、
- (6) 脳の神経細胞死が脳虚血に起因する遅発性神経細胞死である、上記(5)記載の抑制剤、
- 25 (7) HGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の神経細胞のアポトーシス抑制剤、
- (8) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子を有効成分とし、且つHGFタンパク及び／又はVEGFタンパクとの併用に供するための、上記(1)～(7)いずれかに記載の剤、

- (9) HGF遺伝子を有効成分とし、且つHGFタンパクとの併用に供するための、上記(8)記載の剤、
- (10) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子がHVJーリポソームの形態にある、上記(1)～(9)いずれかに記載の剤、
- 5 (11) クモ膜下腔へ投与するための、上記(1)～(10)いずれかに記載の剤、
- (12) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子と薬学的に許容しうる溶剤とを混合することからなる、上記(1)～(11)のいずれかに記載の剤の製造方法、
- (13) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をヒトに導入することを含む、
- 10 脳血管障害の治療又は予防法、
- (14) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳の血流量低下の治療又は予防法、
- (15) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳の血管新生促進法、
- 15 (16) HGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳の神経細胞死の抑制法、
- (17) HGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳の神経細胞のアポトーシス抑制法、
- (18) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をヒトのクモ膜下腔へ投与する、上記(13)～(17)のいずれかに記載の方法、
- 20 (19) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子の導入と共に、HGFタンパク及び／又はVEGFタンパクを投与する、上記(13)～(18)のいずれかに記載の方法、
- (20) HGF遺伝子の導入と共に、HGFタンパクを投与する、上記(19)記載の方法、
- 25 (21) 脳血管障害の治療又は予防剤の製造のためのHGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子の使用、
- (22) 脳の血流量低下の治療又は予防剤の製造のためのHGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子の使用、
- (23) 脳の血管新生促進剤の製造のためのHGF遺伝子及び／又はVEGF遺

伝子の使用、

(24) 脳の神経細胞死の抑制剤の製造のためのHGF遺伝子の使用、

(25) 脳の神経細胞のアポトーシス抑制剤の製造のためのHGF遺伝子の使用。

図面の簡単な説明

5 図1は、脳表面の $\beta$ -gal ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ) の発現を示す生物の形態写真である。下、HVJ-リポソーム (1 ml) の内頸動脈内注入; 中、HVJ-リポソーム (100  $\mu$ l) の大槽 (クモ膜下腔) 内注入; 上、HVJ-リポソーム (20  $\mu$ l) の側脳室注入。各群、n = 4。

図2は、脳内の $\beta$ -gal ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ) の発現を示す生物の形態写真  
10 である。左、内頸動脈内注入; 中、側脳室注入; 右、大槽 (クモ膜下腔) 内注入。

図3は、エリザ法によるラット脳脊髄液中でのヒトHGFのインビボタンパク質発現を示すグラフである。図中、UTはHGF遺伝子を含まない発現ベクターで処置したラットを、7 dはHGF遺伝子導入7日目のラットを、14 dはHGF遺伝子導入14日目のラットを示す。また図中、-は頸動脈の閉塞無しを、  
15 た+は閉塞有りを示す。縦軸はHGFの濃度 (ng/ml) を示す。 \*\*: UTに対して $P < 0.01$ 。各群、n = 4。

図4は、エリザ法によるラット脳脊髄液中でのヒトVEGFのインビボタンパク質発現を示すグラフである。図中、UTはVEGF遺伝子を含まない発現ベクターで処置したラットを、7 dはVEGF遺伝子導入7日目のラットを、14 d  
20 はVEGF遺伝子導入14日目のラットを示す。また図中、-は頸動脈の閉塞無しを、また+は閉塞有りを示す。縦軸はVEGFの濃度 (pg/ml) を示す。 \*\*: UTに対して $P < 0.01$ 。各群、n = 4。

図5は、HGF遺伝子のトランスフェクション前及び7日後の脳内及び周辺の内皮細胞に対する細胞組織化学的染色の結果を示す顕微鏡写真である。A (上  
25 左)、頸動脈を閉塞しないでベクター (HGF遺伝子を含まない発現ベクター) をトランスフェクションした脳; B (上右)、頸動脈を閉塞しないでHGF遺伝子をトランスフェクションした脳; C (下左)、頸動脈閉塞後7日目のベクターをトランスフェクションした脳; D (下右)、頸動脈閉塞後7日目のHGF遺伝子をトランスフェクションした脳。各群、n = 4。



図6は、レーザードップラーイメージャー(LDI)で測定した脳血流の時間経過を示すグラフである。図中、preは閉塞前を、postは頸動脈閉塞直後を、7dは閉塞7日後を、14dは閉塞14日後の結果を示す。縦軸(FLUX)は脳灌流平均値を示す。preに対して、\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 。各群、 $n = 6$ 。

- 5 図7は、頸動脈閉塞後7日目にLDIで測定したCBFを示すグラフである。図中、UTは発現ベクターで処置したラットを、RCは組換えHGF(200 $\mu$ g)で処置したラットを、GENEはHGF遺伝子(10 $\mu$ g)で処置したラットを、GENE&RCは組換えHGF(200 $\mu$ g)とHGF遺伝子(10 $\mu$ g)で処置したラットを、またVEGFにおけるGENEはVEGF遺伝子(20 $\mu$ g/ml)で処
- 10 置したラットの結果を示す。また縦軸(FLUX)は脳灌流平均値を示す。UTに対して、\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 。各群、 $n = 6$ 。

- 図8は、頸動脈の閉塞前及び直後にLDIで測定したCBFを示すグラフである。図中preは、対照ラットの頸動脈閉塞前を、postは対照ラットの頸動脈閉塞直後を、HGFは動脈閉塞7日前にHGFトランスフェクションを行ったラットの頸動脈閉塞直後の結果を、VEGFは動脈閉塞7日前にVEGFトランスフェク
- 15 ションを行ったラットの頸動脈閉塞直後の結果を示す。postに対して、\*\* $P < 0.01$ 。各群、 $n = 5$ 。

図9は、脳表面(図中Brain surface)及び海馬CA-1領域(図中CA1)の $\beta$ -gal( $\beta$ -ガラクトシターゼ)の発現を示す、顕微鏡写真である。

- 20 図10は、両側頸動脈の虚血刺激により、海馬CA-1領域に遅発性神経細胞死が認められた結果を示す、顕微鏡写真である。図中、Sham ope. 7daysはコントロール(外科処置のみで虚血刺激なし)7日目の結果を、またVehicle(4days, 7days)は両側頸動脈虚血後4日目及び7日目の結果を、それぞれ示す。

- 図11は、両側頸動脈虚血刺激の前後にHGF遺伝子あるいは組換えHGFタンパクを導入することにより、海馬CA-1領域の遅発性神経細胞死が抑制された結果を示す、顕微鏡写真である。図中、Post HGF gene(4days, 7days)は両側頸動脈虚血直後にHGF遺伝子を導入した4日目及び7日目の結果を、Pre HGF gene 7daysは両側頸動脈虚血直前にHGF遺伝子を導入した7日目の結果を、またr-HGF 7daysは両側頸動脈虚血直後に組換えHGFタンパクを導入した7日目の結果を、それぞれ示
- 25

す。

図12は、生存している神経細胞を染色することにより、海馬CA-1領域の神経細胞密度を測定した結果を示すグラフである。図中、縦軸は細胞密度（生存神経細胞数/mm）を示す。また横軸におけるshamはコントロール（虚血刺激なし）の結果を、vehicleは両側頸動脈虚血の結果を、Post Gは両側頸動脈虚血後にHGF遺伝子を導入した結果を、Pre Gは両側頸動脈虚血前にHGF遺伝子を導入した結果を、またPost Rは両側頸動脈虚血後に組換えHGFタンパクを導入した結果を、それぞれ示す。vehicleに対して、\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 。

図13は、両側頸動脈虚血後にHGF遺伝子を導入し、7日後の脳脊髄液中のHGFのタンパク濃度をELISA法により測定した結果を示すグラフである。図中、縦軸はHGFのタンパク濃度（ng/ml）を示し、また横軸中post HGFはHGF遺伝子導入の結果を、shamはコントロール（虚血刺激なし）の結果を、それぞれ示す。またN. D.は検出されなかった結果を示す。

図14は、海馬CA-1領域におけるC-Metの発現を、免疫染色法により解析した結果を示す、顕微鏡写真である。

図15は、海馬CA-1領域においてアポトーシスを起こした神経細胞をTUNEL法により染色した結果を示す、顕微鏡写真である。図中、DND 7daysは両側頸動脈虚血後7日目で遅発性神経細胞死を起こした神経細胞を、Post HGF gene 7daysは両側頸動脈虚血直後にHGF遺伝子を導入した7日目の結果を、またPre HGF gene 7daysは両側頸動脈虚血直前にHGF遺伝子を導入した7日目の結果を、それぞれ示す。

図16は、海馬CA-1領域におけるBcl-xLの発現を免疫染色法により解析した結果を示す、顕微鏡写真である。図中、sham.はコントロール（虚血刺激なし）の結果を、post HGF（4days, 7days）は両側頸動脈虚血直後にHGF遺伝子を導入した4日目及び7日目の結果を、それぞれ示す。

図17は、両側頸動脈虚血直後にHGF遺伝子を導入後7日目の、海馬CA-1領域におけるHSP70の発現を、免疫染色により解析した結果を示す顕微鏡写真である。

図18は、海馬CA-1領域におけるHSP70の発現を、免疫染色により解析した結果を示す顕微鏡写真である。図中Sham.はコントロール（虚血刺激なし）の結果

を、Post HGF 7Dは両側頸動脈虚血直後にHGF遺伝子を導入した7日目の結果を、それぞれ示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明において使用される「HGF遺伝子」とは、HGF（HGFタンパク）  
5 を発現可能な遺伝子を指す。具体的には、Nature, 342, 440(1989)、特許第  
2777678号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967(1989)、Biochem.  
Biophys. Res. Commun., 172, 321(1990)などに記載のHGFのcDNAを後述の如  
き適当な発現ベクター（非ウイルスベクター、ウイルスベクター）に組み込んだ  
ものが挙げられる。ここでHGFをコードするcDNAの塩基配列は、前記文献  
10 に記載されている他、Genbank等のデータベースにも登録されている。従ってこ  
れらの配列情報に基づき適当なDNA部分をPCRのプライマーとして用い、例  
えば肝臓や白血球由来のmRNAに対してRT-PCR反応を行うことなどによ  
り、HGFのcDNAをクローニングすることができる。これらのクローニング  
は、例えばMolecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory  
15 Press(1989)等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。

さらに、本発明のHGF遺伝子は前述のものに限定されず、発現されるタンパ  
ク質がHGFと実質的に同じ作用を有する遺伝子である限り、本発明のHGF遺  
伝子として使用できる。すなわち、1) 前記cDNAとストリンジェントな条件  
下でハイブリダイズするDNAや、2) 前記cDNAによりコードされるタンパ  
20 ク質のアミノ酸配列に対して1若しくは複数（好ましくは数個）のアミノ酸が置  
換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするD  
NA、などのうち、HGFとしての作用を有するタンパクをコードするものであ  
れば、本発明のHGF遺伝子の範疇に含まれる。ここで前記1) 及び2) のDN  
Aは、例えば部位特異的突然変異誘発法、PCR法、又は通常のハイブリダイゼ  
25 ーション法などにより容易に得ることができ、具体的には前記Molecular  
Cloning等の基本書を参考にして行うことができる。

発明において使用される「VEGF遺伝子」とは、VEGF（VEGFタンパ  
ク）を発現可能な遺伝子を指す。すなわち、VEGFのcDNAを後述の如き適  
当な発現ベクター（非ウイルスベクター、ウイルスベクター）に組み込んだもの

が例示される。VEGF遺伝子は、ヒトにおいては転写に際しての選択的スプライシングにより、4種類のサブタイプ(VEGF121、VEGF165、VEGF189、VEGF206)の存在が報告されている(Science, 219, 983(1983)、J. Clin. Invest., 84, 1470 (1989)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 851(1989))。本発明においてはこれ  
5 らのいずれのVEGF遺伝子をも使用することが可能であるが、生物学的に最も活性が強いという観点から、VEGF165遺伝子がより好ましい。さらに前記のHGFの場合と同様に、これらVEGFの遺伝子に対して改変等を施した遺伝子であっても、VEGFとしての作用を有するタンパクをコードする遺伝子である限り、本発明のVEGF遺伝子の範疇に含まれる。

- 10 当該VEGF遺伝子もHGF遺伝子と同様に、文献(例えば Science, 246, 1306(1989))記載の配列及びデータベースに登録されている配列情報に基づき、当業者ならば容易にクローニングすることができ、またその改変等も容易に行うことができる。

本発明においては、HGF遺伝子又はVEGF遺伝子により、脳血管障害が治  
15 療又は予防されることを初めて明らかにしたものである。すなわち本発明において初めて、(a) HGF遺伝子又はVEGF遺伝子トランスフェクション後、長期間にわたってこれらのタンパク質が脳内で検出されること、(b) HGF遺伝子又はVEGF遺伝子トランスフェクションによる治療法により虚血状態の脳表面に血管新生を誘導できること、(c) HGF遺伝子又はVEGF遺伝子のトラ  
20 ンスフェクションが血管の閉塞によって引き起こされる脳の血流量低下を治療するのに有効であること、そして(d) この治療法は、閉塞前に実施したときも有効であることを明らかにした。従ってHGF遺伝子及びVEGF遺伝子は、脳虚血に起因する障害、脳の血流量低下を伴う障害、脳の血管新生を促進することにより改善が期待される障害等の、種々の脳血管障害に対する治療又は予防剤とし  
25 て、有効に使用される。

具体的には、脳血管閉塞、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、脳卒中(クモ膜下出血や一過性脳虚血、脳動脈硬化症などを含む)、脳出血、もやもや病、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆、脳出血後遺症又は脳梗塞後遺症などの治療または予防剤として有効に使用される(以下、本発明の治療又は予防剤を単に遺伝子治療剤と

称することもある)。

さらに本発明者らは、虚血による海馬CA-1領域の遅発性神経細胞死が、HGF遺伝子導入により抑制されること、すなわちHGF遺伝子が脳の神経細胞死を抑制する効果を有することを見出した。そしてこの効果は、c-Metを介した神経細胞のアポトーシス抑制効果に基づくものであることを明らかにした。

ここで海馬CA-1領域とは神経の密集した領域であり、脳虚血による神経細胞死を受け易い領域として知られている。このようにHGF遺伝子は、血管新生作用(血流量低下抑制作用)および神経細胞保護作用の双方の作用に基づき、脳血管障害の治療および予防を達成できることが明らかとなった。

10 またHGF遺伝子は、前記のようにc-Metを介した神経細胞保護効果を有しているため、例えばアルツハイマー病、アルツハイマー型老年痴呆症、筋萎縮性側索硬化症、あるいはパーキンソン氏病といった神経変性疾患の治療又は予防剤としても、有効に使用することができる。

本発明においては、HGF遺伝子、VEGF遺伝子各々単独で用いることもでき、15 両者を併用して使用することも可能である。また、他の血管内皮増殖因子の遺伝子と共に用いることもできる。さらに、HGF遺伝子及び/又はVEGF遺伝子と、HGFタンパク及び/又はVEGFタンパクとを併用することも可能である。好ましくはHGF遺伝子とHGFタンパクとの組み合わせ、又はVEGF遺伝子とVEGFタンパクとの組み合わせであり、さらに好ましくはHGF20 遺伝子とHGFタンパクとの組み合わせである。これに関しては後述の実施例4を参照されたい。

なお、ここで用いるHGFタンパクとしては、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば如何なる方法で調製されたものでも良く、また市販品(例えば東洋紡績株式会社、Code No. HGF-101等)を使用することもできる。前記クローニングにより得られたHGFのcDNAを適当な発現ベクターに挿入し、これを宿主細胞に導入して形質転換体を得、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えHGFタンパクを得ることができる(例えばNatué, 342, 440(1989)、特許第2777678号等参照)。またVEGFタンパクも同様にして得ることができる。

次に、本発明の遺伝子治療において用いられる遺伝子導入方法、導入形態および導入量等について記述する。

- 前記遺伝子を有効成分とする遺伝子治療剤を患者に投与する場合、その投与形態としては非ウイルスベクターを用いた場合と、ウイルスベクターを用いた場合
- 5 の二つに大別され、実験手引書などにその調製法、投与方法が詳しく解説されている（別冊実験医学、遺伝子治療の基礎技術、羊土社、1996、別冊実験医学、遺伝子導入&発現解析実験法、羊土社、1997、日本遺伝子治療学会編遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス、1999）。以下、具体的に説明する。

#### A. 非ウイルスベクターを用いる場合

- 10 慣用の遺伝子発現ベクターに目的とする遺伝子が組み込まれた組換え発現ベクターを用いて、以下のような手法により目的遺伝子を細胞や組織に導入することができる。

- 細胞への遺伝子導入法としては、リポフェクション法、リン酸-カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、微小ガラス管を用いたDNAの直接注入法な
- 15 どが挙げられる。

- また、組織への遺伝子導入法としては、内包型リポソーム（internal type liposome）による遺伝子導入法、静電気型リポソーム（electrostatic type liposome）による遺伝子導入法、HVJ-リポソーム法、改良型HVJ-リポソーム法（HVJ-AVEリポソーム法）、レセプター介在性遺伝子導入法、パーティクル銃で担体（金属粒子）とともにDNA分子を細胞に移入する方法、naked-DNAの直接導入法、正電荷ポリマーによる導入法等のいずれかの方法に供することにより、組換え発現ベクターを細胞内に取り込ませることが可能である。
- 20

- このうちHVJ-リポソームは、脂質二重膜で作られたリポソーム中にDNAを封入し、さらにこのリポソームと不活化したセンダイウイルス
- 25 （Hemagglutinating virus of Japan : HVJ）とを融合させたものである。当該HVJ-リポソーム法は従来のリポソーム法と比較して、細胞膜との融合活性が非常に高いことを特徴とするものであり、好ましい導入形態である。HVJ-リポソームの調製法については文献（実験医学別冊、遺伝子治療の基礎技術、羊土社、1996、遺伝子導入&発現解析実験法、羊土社、1997、J. Clin. Invest. 93, 1458-

1464(1994)、Am. J. Physiol. 271, R1212-1220(1996)) などに詳しく述べられており、また後述の実施例にも詳しく記載されているため、それらを参照されたい。なおHVJとしてはZ株(ATCCより入手可能)が好ましいが、基本的には他のHVJ株(例えば ATCC VR-907や ATCC VR-105など)も用いることができる。

- 5 さらに、naked-DNAの直接導入法は、上記手法のうち最も簡便な手法であり、この観点から好ましい導入法である。

ここで用いられる発現ベクターとしては、生体内で目的遺伝子を発現させることのできるベクターであれば如何なる発現ベクターであっても良いが、例えばpCAGGS (Gene 108, 193-200(1991)) や、pBK-CMV、pCDNA3. 1、  
10 pZeoSV (インビトロゲン社、ストラタジーン社) などの発現ベクターが挙げられる。

#### B. ウイルスベクターを用いる場合

ウイルスベクターとしては、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを用いた方法が代表的なものである。より具体的には、例えば、無  
15 毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンピスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス(HIV)等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに目的とする遺伝子を導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である。

- 20 前記ウイルスベクターのうち、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、この観点からは、アデノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

本発明の遺伝子治療剤の患者への導入法としては、遺伝子治療剤を直接体内に導入するin vivo法、及び、ヒトからある種の細胞を取り出して体外で遺  
25 伝子治療剤を該細胞に導入し、その細胞を体内に戻すex vivo法がある  
(日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、日本遺伝子治療学会編 遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス、1999)。本発明では、in vivo法が好ましい。

患者への投与部位としては、治療目的の疾患、症状などに応じた適当な投与部位が選択される。例えば、頭蓋内へ直接穴を開けて遺伝子を導入する方法の他、側脳室への投与、あるいはクモ膜下腔への投与などが挙げられる。このうちクモ膜下腔への投与は、本発明において開示された新規かつ効率的な投与方法であり、

- 5 本発明の目的、すなわち脳の血流量低下を血管新生で治療し、及び／又は脳の神経細胞死を抑制しようとする際には、クモ膜下腔への投与が好ましい。

製剤形態としては、上記の各投与形態に合った種々の製剤形態（例えば液剤など）をとり得る。例えば有効成分である遺伝子を含有する注射剤とされた場合、当該注射剤は常法により調製することができ、例えば適切な溶剤（PBS等の緩

- 10 衝液、生理食塩水、滅菌水等）に溶解した後、必要に応じてフィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。当該注射剤には必要に応じて慣用の担体等を加えても良い。また、HVJーリポソーム等のリポソームにおいては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などのリポソーム製剤の形態とすることができる。

- 15 また、疾患部位の周囲に遺伝子を存在し易くするために、徐放性の製剤（ミニペレット製剤等）を調製し患部近くに埋め込むことも可能であり、あるいはオスモチックポンプなどを用いて患部に連続的に徐々に投与することも可能である。

製剤中のDNAの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調節することができるが、通常、本発明のDNAとして0.0001－100mg、  
20 好ましくは0.001－10mgであり、これを数日ないし数ヶ月に1回投与するのが好ましい。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

#### 実験 I. HGF 遺伝子及び VEGF 遺伝子による脳の血管新生及び血流量改善効果の検討

##### 25 果の検討

##### 材料及び実験方法

##### 1) 両側頸動脈の結紮

雄スプラグ・ドゥリーラット（350～400g；Charles River Japan、日本国厚木市）をペントバルビタールナトリウム（50mg/kg、腹腔内）で麻酔し、そし



て外科手術の間中自然呼吸させた。頸部中線切開によって、両側頸動脈を露出させ、そして2-0シルクで強く結紮した。

## 2) HVJ-リポソームコンプレックスの調製

HVJ-リポソームを調製するために使用した方法は文献  
5 (J. Clin. Invest. 93, 1458-1464(1994)、Am. J. Physiol. 271, R1212-1220(1996))  
に記載されているとおりである。簡単に述べると、ホスファチジルセリン、ホス  
ファチジルコリン及びコレステロールを1:4.8:2の重量比で混合した。この脂  
質混合物(10mg)はロータリーエバポレーター内でテトラヒドロフランを除去し  
てフラスコの側面に沈着させた。乾燥した脂質は、目的遺伝子の挿入された発現  
10 ベクターを有する200 $\mu$ lの平衡塩類溶液(BSS; 137 $\mu$ M NaCl、5.4 $\mu$ M K  
Cl、10 $\mu$ M トリス-HCl、pH 7.6)中で水和させた。対照群のリポソームは、  
目的遺伝子の挿入のない発現ベクターを含有している(BSS 200 $\mu$ l)。振とう  
及び超音波処理によってリポソームを調製した。

精製HVJ(Z株)は、使用直前に3分間UV照射(1秒当たり110エルグ/  
15 mm<sup>2</sup>)して不活性化した。リポソーム懸濁液(0.5ml、10mgの脂質を含有する)  
をHVJ(総容量4mlのBSS中10,000血球凝集単位)と混合した。この混合物  
を4℃で5分間、そしてその後静かに振とうしながら37℃で30分間インキュー  
トした。フリーのHVJはショ糖密度勾配遠心によってHVJ-リポソームから  
除去した。ショ糖勾配の頂部層を集めて使用した。プラスミドDNAの最終濃度  
20 は、以前の報告(J. Clin. Invest. 93, 1458-1464(1994)、Am. J. Physiol. 271,  
R1212-1220(1996))に従って計算したとき、20 $\mu$ g/mlと同等であった。こ  
の調製方法は、最大のトランスフェクション効率を達成するように最適化されて  
いる。

## 3) インビボ遺伝子導入

25 インビボでの効率的な遺伝子導入法を確立するために、我々はHVJ-リポソ  
ームとコンプレックスを形成したプラスミドを送達する3つの異なる方法; 1)  
内頸動脈への直接注入、2) 側脳室への注入、及び3) 大槽(クモ膜下腔)への  
注入を試験した。

内頸動脈への注入では、雄スプラッグ・ドゥリーラット(350~400g)をペン

トバルビタールナトリウム (50mg/kg、腹腔内) で麻酔し、そして左総頸動脈まで切開してポリエチレンカテーテル (P E-50、Clay Adams、ニュージャージー州パーシッパニー) を左外頸動脈に導入した (Rakugi等)。遠位外頸動脈区域は一時的結紮糸で短時間隔離した。HV J-リボソームコンプレックス (1  
5 ml) を外頸動脈区域に注入した。注入後注入カニューレを除去し、そして結紮糸を緩めて総頸動脈への血流を回復させた。

側脳室への注入では、麻酔したラットを定位固定枠 (Narishige Scientific Instrument Laboratory、日本国東京都) に置き、そして頭蓋を露出させた。特別に設計したテフロン連結器 (F E P管、Bioanalytical Systems、インディ  
10 アナ州ウェストラファイアット) を有するステンレス鋼カニューレ (30ゲージ; Becton Dickinson、ニュージャージー州フランクリンレイクス) を、文献 (Am. J. Physiol. 271, R1212-1220 (1996)) に記載されているようにして左側脳室に導入した。定位固定座標は次のとおりであった。: プレグマの後ろ1.3mm、中線の側方2.1mm、及び頭蓋表面の下3.6mm。HV J-リボソームコンプレックスを側  
15 脳室に注入した (20  $\mu$  l)。HV J-リボソームコンプレックスを注入した後、注入カニューレを除去した。四肢の痙攣又は異常運動のような挙動変化は、注入を受けたどの動物でも観察されなかった。

クモ膜下腔への注入では、各動物の頭部を臥位に固定し、そして後頭骨頸中線切開によって環椎後頭膜を露出させた。ステンレス鋼カニューレ (27ゲージ;  
20 Becton Dickinson、ニュージャージー州フランクリンレイクス) をクモ膜下腔に導入した。カニューレの位置を確認しそして脳内圧の上昇を回避するために100  $\mu$  lの脳脊髄液を除去した後に、HV J-リボソーム溶液 (100  $\mu$  l: 100  $\mu$  g/ml) を大槽 (クモ膜下腔) に1分以上かけて注意深く注入した。その後、動物は30分間頭部を下にして置いた。予防的投与量の抗生物質 (30,000Uのペニシ  
25 リンG) を投与して無菌手順を完了させた。

#### 4) レーザードップラー画像化

レーザードップラーイメージャー (LDI) を使用して、手術後2週間に亘って連続的血流測定を記録した。LDIシステム (Moore Instruments Ltd.、英国デボン) には、12 $\times$ 12cmの組織表面を600  $\mu$  mの深さまで連続的に走査する光

線を発生させるために2mWのヘリウム-ネオンレーザーが組み込まれている。走査中に、血管系を移動する血球はドップラー原理に従って投射光の振動数を変化させる。フォトダイオードは逆方向の散乱光を集めるので、元の光強度の変動は0～10Vの範囲の電圧変動に転換される。0Vの灌流出力値を0%の灌流に目盛り付けし、一方10Vを100%の灌流に目盛り付けした。走査が終了しそして逆方向の散乱光が全ての測定部位から集められると、血流分布を示す色分けされた画像がテレビモニターに表示される。灌流シグナルは6つの異なる区分に分けられ、そして各々は別個の色として表示される。血流量低下又は灌流無しは暗青色として示され、一方最大灌流は赤色として表示される。

- 10 LDIを使用して、閉塞前、直後、7日目及び14日目の脳表面の灌流を記録した。頭皮中線切開部を通して、電気ドリルで12×12mmの骨窓を作った。この骨窓上で連続的測定値が得られた。色分けされた画像が記録され、そして分析は各ラットについて灌流平均値を計算して実施した。周辺光や温度を含む変数を考慮するために、灌流計算値は後（虚血）対前（非処置）の脳の比として表した。

15 5) 組織病理学的検査

- 3%のパラホルムアルデヒド/20%のショ糖溶液中で1日間固定した後に、X-gal染色用に、25 $\mu$ mの冠状面冷凍切片を100 $\mu$ mごとに作製した。切片をX-galで染色して $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現している染色されたニューロンを同定した。アルカリホスファターゼ（ALP）染色用に、25 $\mu$ mの冠状面冷凍切片を100 $\mu$ mごとに作製した。これらの切片を0.3%の過酸化水素を含有するPBSと共にインキュベートして、内因性ペルオキシダーゼ活性を下げ、そしてその後、10%のウマ血清を有するPBS中で希釈した一次抗体又はレクチンと共に室温で60分間インキュベートした。2%のウマ血清を含有するトリス緩衝生理食塩液中で3回洗浄した後、種に適するビオチン付加二次抗体、続いてアビジン-ビオチンペ  
25 ルオキシダーゼコンプレックス（Vectastain ABC kit, PK 6100, Vector Laboratories、カリフォルニア州バーリングヘム）をインキュベートした。抗体結合はジアミノベンジジンを使用して視覚化した。一次抗体を省略し、そしてタイプ及びクラスに適合した無関係な免疫グロブリンで染色して各抗体の陰性対照として使用した。

# 6) 脳脊髄液 (CSF) 中の HGF 及び VEGF に対する ELISA 法

両側頸動脈の閉塞前並びに 7 及び 14 日後のラットから得られた CSF (100  $\mu$ l) をこれらの実験用に使用した。ラット及びヒト HGF は ELISA キット (Institute of Immunology、東京都) で測定し、そしてヒト VEGF も ELISA

5    SA キット (R&D systems、ミネソタ州ミネアポリス) で測定した。

# 7) 実験材料

ヒト HGF 遺伝子は、ヒトの HGF の cDNA (特許第 2777678 号) を常法によりクローニングし、これを発現ベクター p cDNA (インビトロゲン社製) に挿入したものをを用いた。

10    ヒト VEGF 遺伝子は、ヒト VEGF 165 の cDNA (Science 246, 1306 (1989)) を常法によりクローニングし、これを発現ベクター pUC-CAGGS に挿入したものをを用いた。

ヒト組換え HGF は、ヒト HGF cDNA (特許第 2777678 号) を発現ベクター p cDNA (インビトロゲン社製) に挿入した組換え発現ベクターでチャイニー

15    ズハムスター卵巣細胞 (ATCC) 又は C-127 細胞 (ATCC) をトランスフェクションした後、その培養培地から常法により精製したものをを用いた。

上記の材料及び実験方法に基づき、以下の実施例 1 ~ 4 を行った。

# 実施例 1

インビボでの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のトランスフェクションにおける HV

20    J-リポソーム送達系の効果

導入する遺伝子として  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (インビトロゲン社製、HV J リポソーム中の濃度: 20  $\mu$ g/ml) を使用し、上記の材料及び実験方法の記載に従って HV J-リポソームを調製した。

まず、HV J-リポソームコンプレックスをラットの内頸動脈に直接注入して、  
25    脳に到達させた。しかしながら、上記頸動脈での動脈内注入では、注入後 3 及び 7 日目に脳又は微小血管内皮細胞での発現は殆ど生じなかった (データは示していない)。それ故、HV J-リポソームを側脳室及びクモ膜下腔に注入することとした。HV J-リポソーム法による  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の注入はどちらも注入後 3 及び 7 日目に  $\beta$ -gal の顕著な発現を生じさせた (図 1 及び図 2)。側

脳に注入したとき、 $\beta$ -gal発現は主として側脳室及び脈絡膜叢周辺に観察された。対照的に、クモ膜下腔に注入したとき、 $\beta$ -gal発現は脳表面に観察された。以上の結果より、脳の血流量低下を血管新生で治療しようと試みるとき、クモ膜下腔への注入を使用することがより良好であることが明らかとなった。

## 5 実施例 2

### HGF及びVEGF遺伝子のインビボトランスフェクション

HGFやVEGF遺伝子の遺伝子導入の効果を知らるために、エリザ法で脳脊髄液 (CSF) 中でのこれら分子のタンパク質発現を測定した ( $n=4$ 、各群)。

- 最初に両側頸動脈の閉塞前、7日後及び14日後に対照ラット (HGFやVEGF遺伝子挿入のない発現ベクターで処置) のCSF中のヒトHGF及びVEGFを測定したが、これらのタンパク質の濃度は検出されなかった (図3及び図4)。

次に、HGF遺伝子 (HVJリボソーム中の濃度:  $20 \mu\text{g/ml}$ ) を頸動脈閉塞直後にクモ膜下腔に導入したラットのCSF中のヒトHGFタンパク質濃度を測定した。トランスフェクション後7日目に、ヒトHGFが検出されたが、ラット

- 15 HGFは検出されなかった (図3)。頸動脈を閉塞されていないラット ( $1.63 \pm 0.16\text{ng/ml}$ ) と頸動脈を閉塞されたラット ( $1.67 \pm 0.29\text{ng/ml}$ ) 間で顕著な差異はなかった。トランスフェクション後14日目でさえ、ヒトHGFが ( $0.40 \pm 0.04\text{ng/ml}$ ) で検出された (図3)。

- 上記のHGF遺伝子と同様の手法により、VEGF遺伝子 (HVJリボソーム中の濃度:  $20 \mu\text{g/ml}$ ) をクモ膜下腔に導入したところ、CSF中のヒトVEGFの濃度はHGFよりはるかに低かった (図4) (7日目; 頸動脈を閉塞されていないラットで  $18.9 \pm 2.9\text{pg/ml}$ 、頸動脈を閉塞されたラットで  $16.8 \pm 5.8\text{pg/ml}$ 、14日目; 頸動脈を閉塞されていないラットで  $11.7 \pm 1.6\text{pg/ml}$ 、頸動脈を閉塞されたラットで  $9.9 \pm 1.5\text{pg/ml}$ )。これらの間のこの差異の理由は不明であるが、
- 25 慢性の血流量低下を治療するためにはHGFを適用して血管新生を生じさせることがより良好であるように思われる。

## 実施例 3

### HGFトランスフェクションによる脳表面での血管新生

実施例2と同様の処置を施したラットの組織を用いて、CNSにおけるHGF

遺伝子導入の血管新生効果を確認した。すなわち、血管内皮細胞を検出するアルカリホスファターゼ（ALP）染色を使用した組織病理学的分析を実施して、脳内及び周辺の内皮細胞を検出した。HGF遺伝子導入されていないラットでは、ALP陽性細胞は両側頸動脈の閉塞前及び7日後の脳の内部に限定されていた（図5のA、C）。興味深いことにHGF遺伝子導入ラットでは、ALP陽性細胞は脳表面に観察され、両側頸動脈を閉塞されていないラットより閉塞されたラットでより多く脳表面に観察された（図5のB、D）。従ってこれらの結果は、HGF遺伝子導入によって、特に虚血状態の脳表面に血管新生が生じるものと考えられた。

#### 10 実施例4

##### LDIで測定したラットの脳血流（CBF）

両側頸動脈閉塞前後のラットのCBFを測定した。最初に、閉塞前、直後、7日後及び14日後に遺伝子を導入されていないラットのCBFの変化を分析した。予期されたように、CBFは両側頸動脈の閉塞直後に減少し、そして時間依存的に徐々に増加した（図6）。しかしながら、CBFは非処置ラットと比較して閉塞後7及び14日目にやはり顕著により低かった（図6）。

次に、組換えHGF（200 $\mu$ g）、HGF遺伝子（HVJリポソーム中の濃度：20 $\mu$ g/ml）、及び組換えHGFとHGF遺伝子の組合せ物で処置したラットを測定した。これらHGF遺伝子及び組換えHGFは、実施例2および3と同じくクモ膜下腔に注入した。各処置は頸動脈閉塞の10分後に実施した。組換えHGFで処置したラットでは、対照ラットと比較してCBFの顕著な増加はなかった（対照：886.1 $\pm$ 99.6、組換えHGF；985.5 $\pm$ 142.4）（図7）。しかしながら、HGF遺伝子導入による処置では閉塞後7日目にCBFが顕著に増加した（1214.5 $\pm$ 145.1）。更に、組換えHGFと遺伝子導入を組合せて処置したラットでは、予想外に、CBFは遺伝子導入単独の場合と比較して7日目にはるかに高かった（1490.3 $\pm$ 197.9）。これらの結果より、HGF遺伝子導入による血管新生が脳の慢性的な血流量低下を改善し、そして動脈閉塞後に処置したとき、遺伝子と組換えHGFの組合せが最も効果的であることが示された。

他方、VEGF遺伝子導入もCBFを増加させたことから（1122.8 $\pm$ 265.3）

(図7)、VEGF遺伝子も脳の血流量低下の改善に有用であることが明らかとなった。

- 次に、動脈閉塞前に実施したとき、この処置が有効であり得るかどうかを検討した。興味深いことに、HGF又はVEGF遺伝子で動脈閉塞前に処置すると頸動脈閉塞によるCBFの減少を防止した(対照;  $459.4 \pm 97.4$ 、HGF;  $796.8 \pm 204$ 、VEGF;  $737.6 \pm 211.5$ )(図8)。これらの結果は、虚血前に送達されたとき、HGFとVEGF遺伝子導入が動脈閉塞による血流量低下を防止(予防)するのに有効であることを示している。

#### 実験 I I . HGF 遺伝子による脳の神経細胞死の抑制効果の検討

#### 10 実験方法

実験に用いたヒトHGF遺伝子含有HVJ-リボソームコンプレックス及びヒト組換えHGFは、前記実験 I . と同様にして調製した。

- 実験には雄性砂ネズミ(体重50g~70g)を使用した。24℃に維持された部屋で飼育し、水と食餌は自由摂取とした。この砂ネズミを以下の5つのグループに分けた。「sham」: コントロールグループ(虚血刺激なしグループ)、  
「vehicle」: 両側頸動脈5分間虚血グループ、「post G」: 両側頸動脈5分間虚血後HGF遺伝子導入グループ、「pre G」: 両側頸動脈5分間虚血前HGF遺伝子導入グループ、「post R」: 両側頸動脈5分間虚血後1回リコンビナントHGF投与グループ。麻酔はフェイスマスクを用いて導入は3%ハロセンにて行い、そして1.5%ハロセン、20%酸素、80%窒素の混合気で維持した。体温(直腸温)は常にモニターしながら、37度前後にヒートパッドを用いて維持した。両側頸動脈を露出後、速やかに血管クリップを用いて5分間血流を完全遮断した。その後、クリップを解除、血流を再開した。外科処置の直前または直後に、HVJリボソーム法を用いてヒトHGF遺伝子(20 $\mu$ g)をクモ膜下腔より髄液腔へ導入した。リコンビナントHGF(30 $\mu$ g)は、外科処置直後にクモ膜下腔より髄液腔へ投与した。術後もケージを37℃に維持し、回復を待った。コントロールグループは血流遮断以外の外科処置を他のグループと同様に行った。虚血4、7日後において、脳を摘出し、切片をHE染色、TUNEL染色、免疫染色することにより、病理組織学的な解析を行った。脳脊髄液中のHGF濃度の測定は、ヒトHGF ELISAキットを用いて行った。

上記実験方法に基づき、以下の実施例5を行った。

#### 実施例5

##### HGF遺伝子トランスフェクションによる海馬CA-1領域の神経細胞死の抑制

正常砂ネズミを用いて、HVJリポソーム法による遺伝子のクモ膜下腔より髄液  
5 腔への導入の確認を行なった。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を導入し、脳切片の  
 $\beta$ -Gal染色を行なったところ、脳の表面と海馬CA-1領域に遺伝子の発現が観察  
された(図9)。

両側頸動脈5分間虚血により、脳の海馬CA-1領域に遅発性神経細胞死が認めら  
れた(図10、vehicle群)。それに対しHGF遺伝子(PreGおよびPostG群)ある  
10 いはリコンビナントHGF(PostR群)の投与により、遅発性神経細胞死が有意に抑  
制された(図11及び図12)。PostG群の脳脊髄液中HGF濃度をELISA法により  
測定したところ、7日後においてもHGFの発現が認められた(図13)。よって、  
脳虚血による遅発性神経細胞死の抑制にHGFが有効であることが示された。

HGFレセプターであるc-Metの発現部位を免疫染色法で検討したところ、CA-1領  
15 域に発現が認められ、HGFのシグナルは、このc-Metを介して伝達されることが示  
された(図14)。

さらにTUNEL法によりCA-1領域においてアポトーシスを起こした神経細胞を染  
色したところ、vehicle群で神経細胞のアポトーシスが多数確認された(図1  
5)。それに対しHGF遺伝子投与群(PreGおよびPostG群)では、アポトーシスは  
20 ほとんど検出されなかった(図15)。よってHGF遺伝子の投与は、神経細胞の  
アポトーシスを抑制していると考えられた。アポトーシス抑制のメカニズムを検  
討するため、アポトーシス抑制作用のあるBcl-xLおよびHSP70のCA-1領域におけ  
る発現を、免疫染色により検討した。Bcl-xLの発現を図16に、またHSP70の発  
現を図17及び図18に示した。両タンパクともHGF遺伝子の投与により神経細  
25 胞において発現が誘導された。以上よりHGF遺伝子の投与は、Bcl-xLやHSP70の発  
現を誘導し、神経細胞のアポトーシスを抑制していることが示された。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子を有効成分として含有  
する脳血管障害の治療又は予防剤、あるいは当該治療又は予防剤をクモ膜下腔に



投与することを特徴とする新規な投与方法などを提供することができる。

## 請求の範囲

1. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子を有効成分として含有する、脳血管障害の治療又は予防剤。
- 5 2. 脳血管障害が、脳血管閉塞、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、脳卒中、脳出血、もやもや病、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆、脳出血後遺症又は脳梗塞後遺症である、請求項1記載の治療又は予防剤。
3. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の血流量低下の治療又は予防剤。
- 10 4. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の血管新生促進剤。
5. HGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の神経細胞死の抑制剤。
6. 脳の神経細胞死が脳虚血に起因する遅発性神経細胞死である、請求項5記載の抑制剤。
- 15 7. HGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の神経細胞のアポトーシス抑制剤。
8. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子を有効成分とし、且つHGFタンパク及び／又はVEGFタンパクとの併用に供するための、請求項1～7いずれかに記載の剤。
- 20 9. HGF遺伝子を有効成分とし、且つHGFタンパクとの併用に供するための、請求項8記載の剤。
10. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子がH V J ーリポソームの形態にある、請求項1～9いずれかに記載の剤。
11. クモ膜下腔へ投与するための、請求項1～10いずれかに記載の剤。
- 25 12. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子と薬学的に許容しうる溶剤とを混合することからなる、請求項1～11のいずれかに記載の剤の製造方法。
13. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳血管障害の治療又は予防法。
14. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳

の血流量低下の治療又は予防法。

15. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳の血管新生促進法。

16. HGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳の神経細胞死の抑制法。

5 17. HGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳の神経細胞のアポトーシス抑制法。

18. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をクモ膜下腔へ投与する、請求項13～17のいずれかに記載の方法。

19. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子の導入と共に、HGFタンパク及び／又はVEGFタンパクを投与する、請求項13～18のいずれかに記載の方法。  
10

20. HGF遺伝子の導入と共に、HGFタンパクを投与する、請求項19記載の方法。

21. 脳血管障害の治療又は予防剤の製造のためのHGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子の使用。  
15

22. 脳の血流量低下の治療又は予防剤の製造のためのHGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子の使用。

23. 脳の血管新生促進剤の製造のためのHGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子の使用。

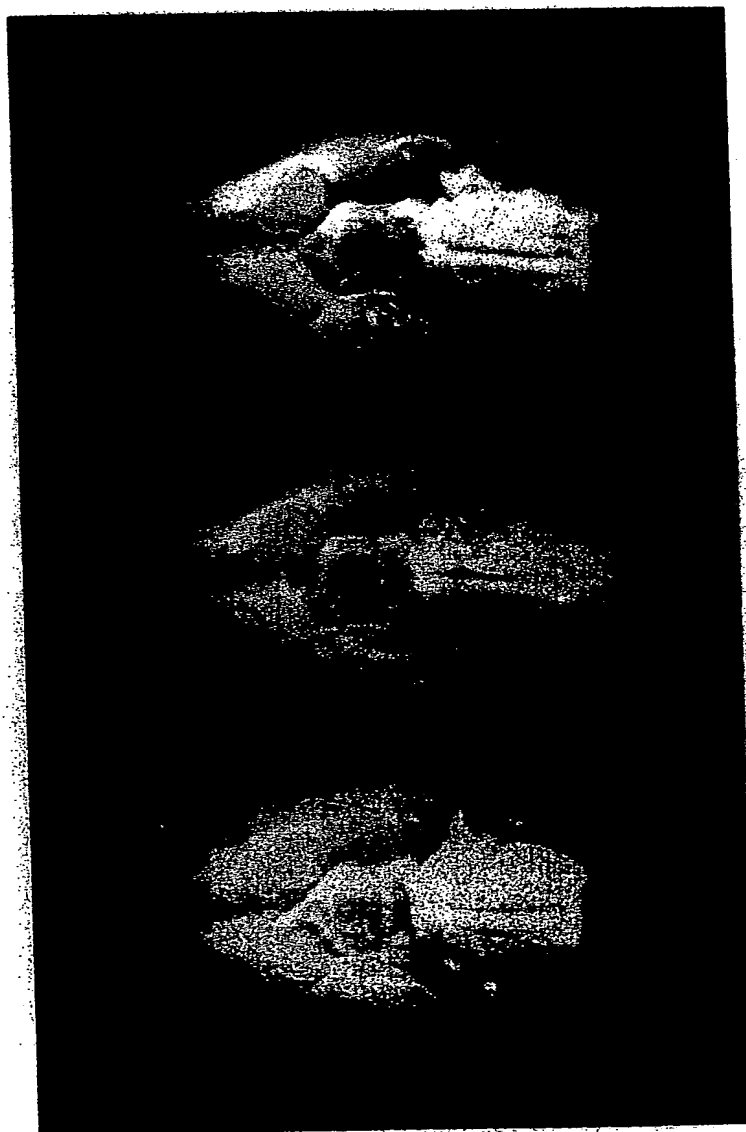
20 24. 脳の神経細胞死の抑制剤の製造のためのHGF遺伝子の使用。

25. 脳の神経細胞のアポトーシス抑制剤の製造のためのHGF遺伝子の使用。



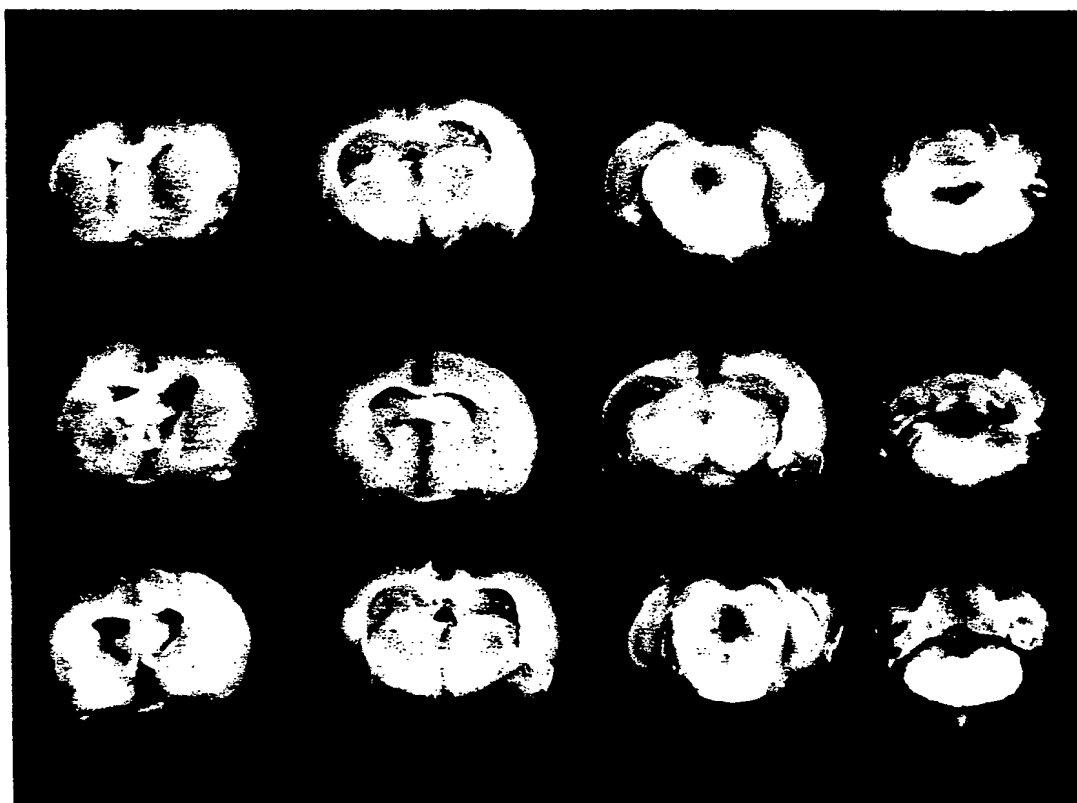
1 / 16

FIG. 1



2 / 16

FIG. 2



3 / 16

FIG. 3

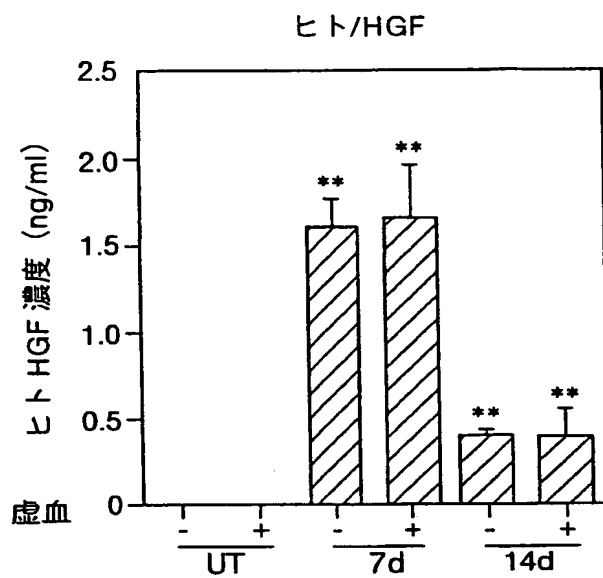


FIG. 4

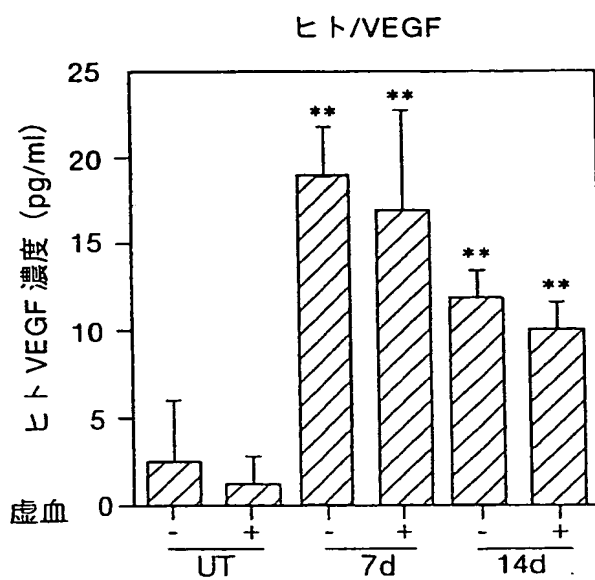
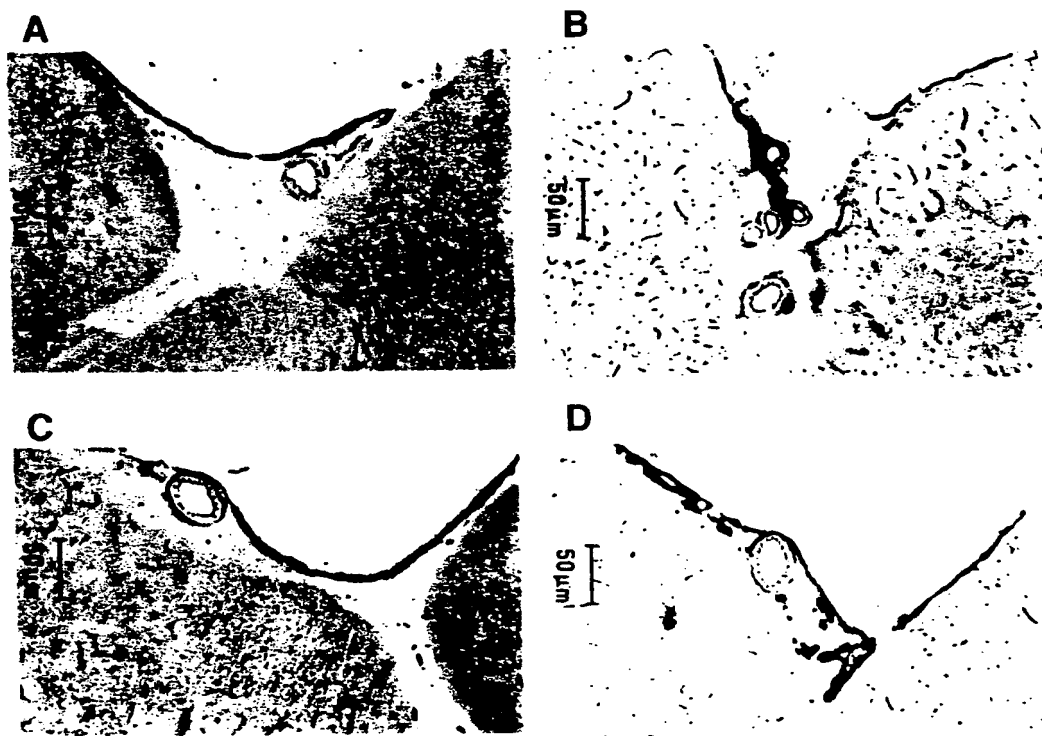


FIG. 5





5 / 16

FIG. 6

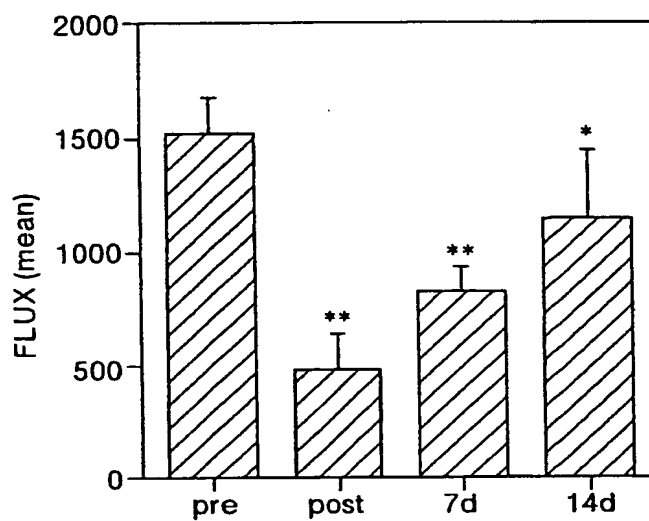
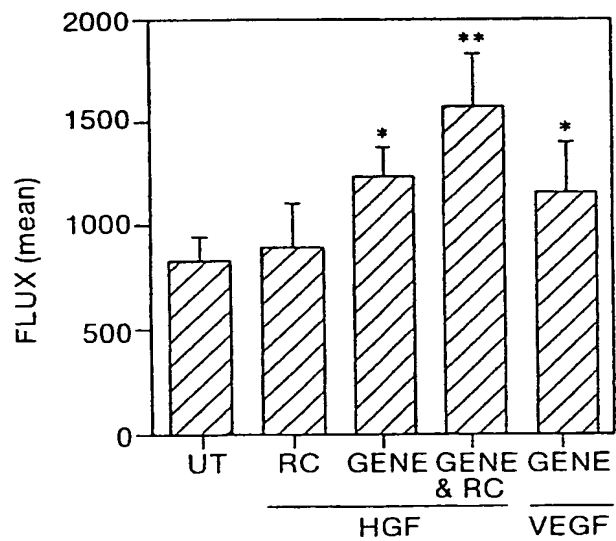
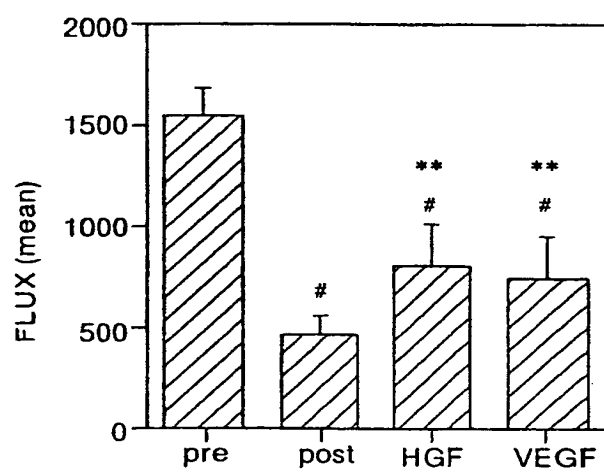


FIG. 7



6 / 16

FIG. 8



7 / 16

FIG. 9

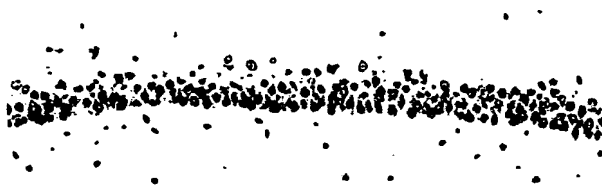
*$\beta$ -Gal stain*



FIG. 10

*Delayed neuronal death*

*Sham ope. 7days*



*Vehicle 4days*



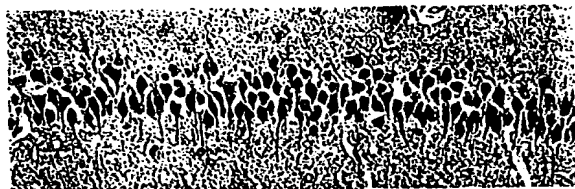
*Vehicle 7days*



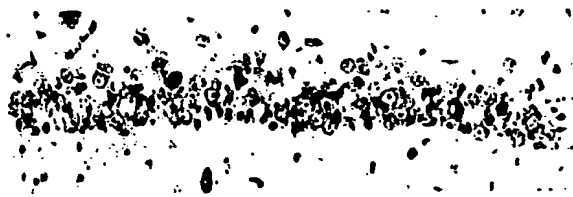
*HE stain*

FIG. 11

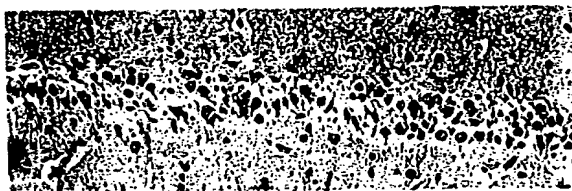
*HGF injection*



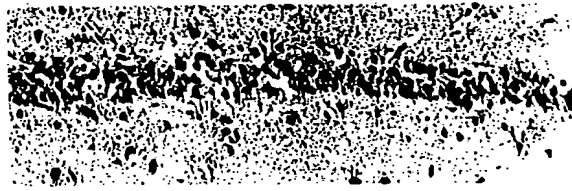
Post HGF gene 4days



Post HGF gene 7days



Pre HGF gene 7days

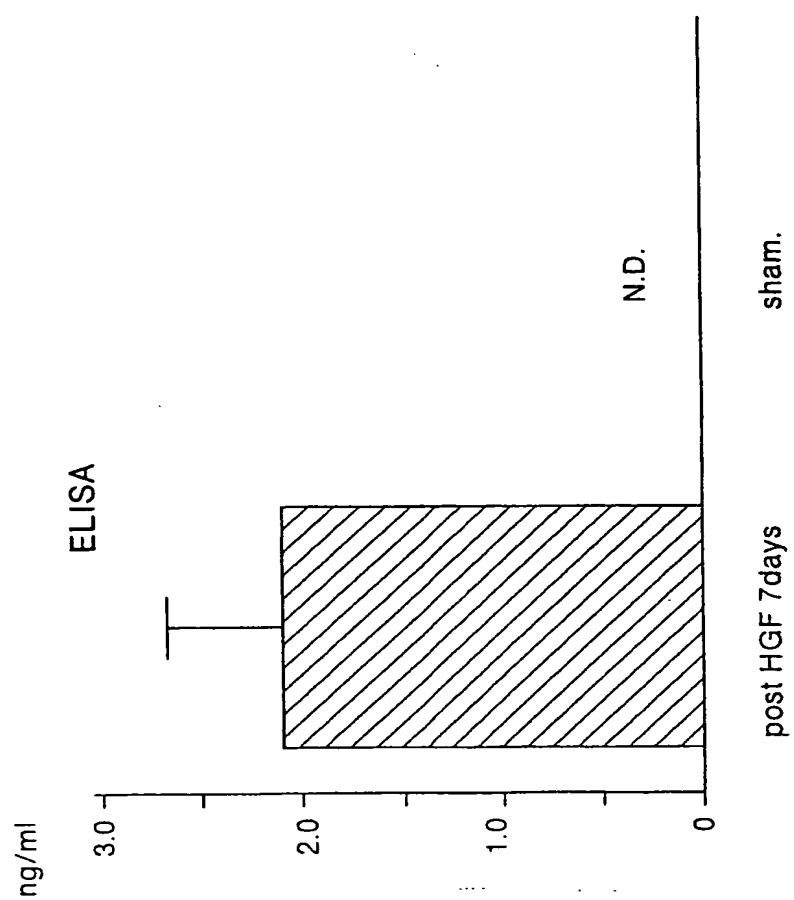


r-HGF 30  $\mu$ g 7days



11 / 16

FIG. 13



12 / 16

FIG. 14

*C-Met*

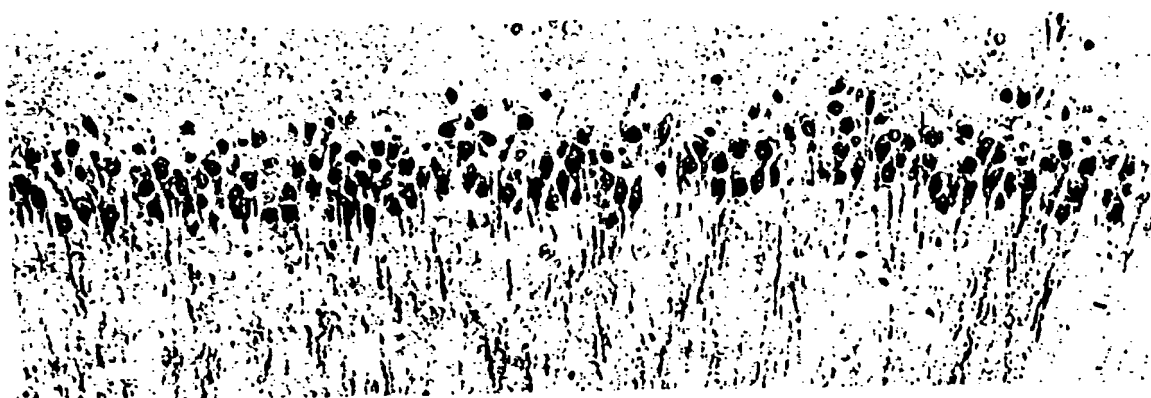
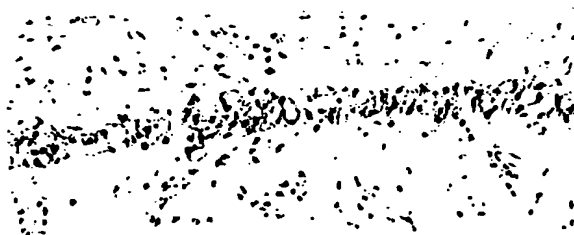




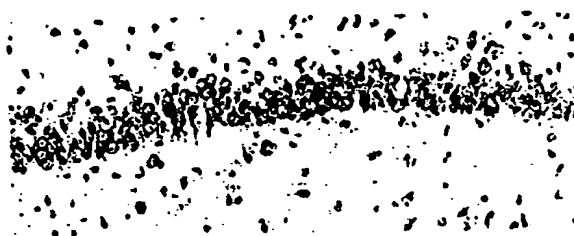
FIG. 15

*TUNEL*

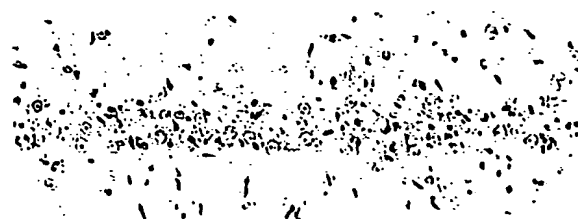
*DND 7days*



*Post HGF gene 7days*



*Pre HGF gene 7days*



14 / 16

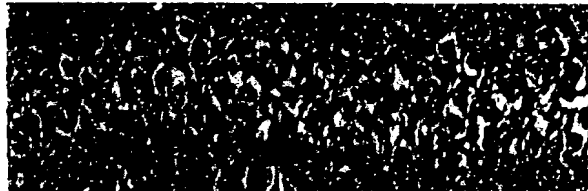
FIG. 16

*bcl-xL*

*sham.*



post HGF 4days



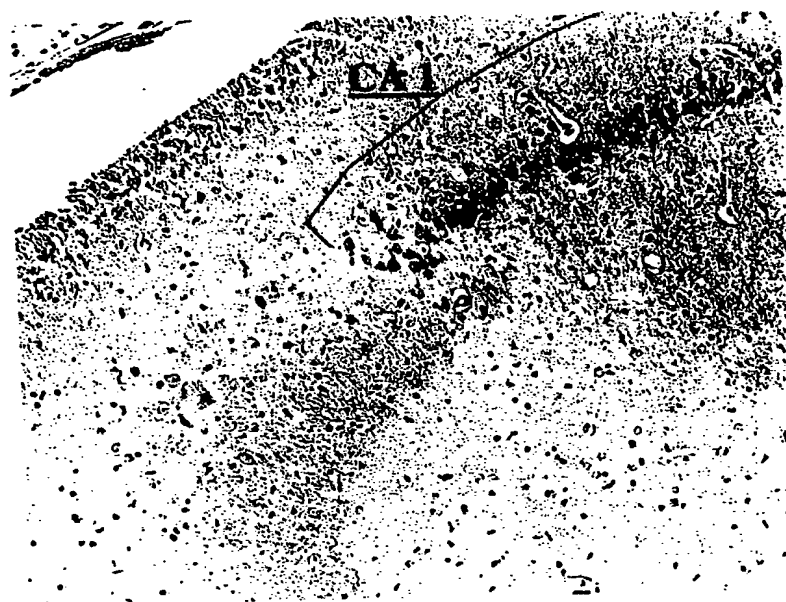
post HGF 7days



15 / 16

FIG. 17

*HSP 70*



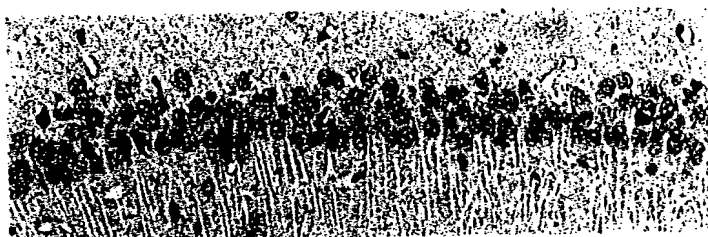
*post HGF 7days*

16 / 16

FIG. 18

# ***HSP70***

Sham.



Post HGF 7D



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**